

23 JUL 2004

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 23 AUG 2004

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:**

103 27 382.4

**Anmeldetag:**

16. Juni 2003

**Anmelder/Inhaber:**

Carl Zeiss Jena GmbH, 07745 Jena/DE

**Bezeichnung:**

Verfahren zur Fluoreszenzmikroskopie

**IPC:**

G 02 B, G 01 N

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 4. Juni 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Wehner

## Verfahren zur Fluoreszenzmikroskopie

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren in der Fluoreszenzmikroskopie, insbesondere der Laser Scanning Mikroskopie.

### Stand der Technik

Ein klassisches Anwendungsgebiet der Lichtmikroskopie zur Untersuchung von biologischen Präparaten ist die Fluoreszenzmikroskopie (Lit.: Pawley, „Handbook of biological confocal Microscopy“; Plenum Press 1995). Hierbei werden bestimmte Farbstoffe zur spezifischen Markierung von Geweben, Zellen oder von Zellteilen oder auch von Materialien verwendet.

Die eingestrahnten Photonen einer bestimmten Energie regen die Farbstoffmoleküle durch die Absorption eines Photons aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand an. Diese Anregung wird meist als Einphotonen-Absorption bezeichnet (Abb. 1a). Die so angeregten Farbstoffmoleküle können auf verschiedene Weise in den Grundzustand zurück gelangen. In der Fluoreszenzmikroskopie ist der Übergang unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons am wichtigsten. Die Wellenlänge des emittierten Photons ist aufgrund der Stokesverschiebung im Vergleich zur Anregungsstrahlung generell rotverschoben, besitzt also eine größere Wellenlänge. Die Stokesverschiebung ermöglicht die Trennung der Fluoreszenzstrahlung von der Anregungsstrahlung.

In Abb.1b ist eine Mehrphotonenanregung dargestellt.

Das Fluoreszenzlicht wird mit geeigneten dichroitischen Strahlteilern in Kombination mit Blockfiltern von der Anregungsstrahlung abgespalten und getrennt beobachtet. Dadurch ist die Darstellung einzelner, mit verschiedenen Farbstoffen eingefärbten Zellteilen, möglich. Grundsätzlich können jedoch auch mehrere Teile eines Präparates gleichzeitig mit verschiedenen sich spezifisch anlagernden Farbstoffen eingefärbt werden (Mehrfachfluoreszenz). Zur Unterscheidung, der von den einzelnen Farbstoffen ausgesendeten Fluoreszenzsignale, werden wiederum spezielle dichroitische Strahlteiler verwendet.

Der Stand der Technik soll im folgenden beispielhaft anhand eines konfokalen Laser-Scanning- Mikroskopes (LSM) erläutert werden (Abb. 2).

Ein LSM gliedert sich im wesentlichen in 4 Module: Lichtquelle, Scanmodul, Detektionseinheit und Mikroskop. Diese Module werden im folgenden näher beschrieben. Es wird zusätzlich auf DE19702753A1 verwiesen.

Zur spezifischen Anregung der verschiedenen Farbstoffe in einem Präparat werden in einem LSM Laser mit verschiedenen Wellenlängen eingesetzt. Die Wahl der Anregungswellenlänge richtet sich nach den Absorptionseigenschaften der zu untersuchenden Farbstoffe. Die Anregungsstrahlung wird im Lichtquellenmodul erzeugt. Zum Einsatz kommen hierbei verschiedene Laser (Argon, Argon Krypton, TiSa-Laser). Weiterhin erfolgt im Lichtquellenmodul die Selektion der Wellenlängen und die Einstellung der Intensität der benötigten Anregungswellenlänge, z.B. durch den Einsatz eines akusto optischen Kristalls. Anschließend gelangt die Laserstrahlung über eine Faser oder eine geeignete Spiegelanordnung in das Scanmodul.

Die in der Lichtquelle erzeugte Laserstrahlung wird mit Hilfe des Objektivs (2) beugungsbegrenzt über die Scanner, die Scanoptik und die Tubuslinse in das Präparat fokussiert. Der Fokus rastert punktförmig die Probe in x-y-Richtung ab. Die Pixelverweilzeiten beim Scannen über die Probe liegen meist im Bereich von weniger als einer Mikrosekunde bis zu einigen Sekunden.

Bei einer konfokalen Detektion (descanned Detection) des Fluoreszenzlichtes, gelangt das Licht das aus der Fokusebene (Specimen) und aus den darüber- und darunterliegenden Ebenen emittiert wird, über die Scanner auf einen dichroitischen Strahlteiler (MDB). Dieser trennt das Fluoreszenzlicht vom Anregungslicht. Anschließend wird das Fluoreszenzlicht auf eine Blende (konfokale Blende / Pinhole) fokussiert, die sich genau in einer zur Fokusebene konjugierten Ebene befindet. Dadurch werden Fluoreszenzlichtanteile außerhalb des Fokus unterdrückt. Durch Variieren der Blendengröße kann die optische Auflösung des Mikroskops eingestellt werden. Hinter der Blende befindet sich ein weiterer dichroitischer Blockfilter (EF) der nochmals die Anregungsstrahlung unterdrückt. Nach Passieren des Blockfilters wird das Fluoreszenzlicht mittels eines Punktdetektors (PMT) gemessen.

Bei Verwendung einer Mehrphotonen-Absorption erfolgt die Anregung der Farbstofffluoreszenz in einem kleinen Volumen an dem die Anregungsintensität besonders hoch ist. Dieser Bereich ist nur unwesentlich größer als der detektierte Bereich bei Verwendung einer konfokalen Anordnung. Der Einsatz einer konfokalen

Blende kann somit entfallen und die Detektion kann direkt nach dem Objektiv erfolgen (non descante Detektion).

In einer weiteren Anordnung zur Detektion einer durch Mehrphotonenabsorption angeregten Farbstofffluoreszenz erfolgt weiterhin eine descante Detektion, jedoch wird diesmal die Pupille des Objektivs in die Detektionseinheit abgebildet (nichtkonfokal descante Detektion).

Von einem dreidimensional ausgeleuchteten Bild wird durch beide Detektionsanordnungen in Verbindung mit der entsprechenden Einphotonen bzw. Mehrphotonen-Absorption nur die Ebene (optischer Schnitt) wiedergegeben, die sich in der Fokusebene des Objektivs befindet. Durch die Aufzeichnung mehrerer optische Schnitte in der x-y Ebene in verschiedenen Tiefen z der Probe kann anschließend rechnergestützt ein dreidimensionales Bild der Probe generiert werden. Das LSM ist somit zur Untersuchung von dicken Präparaten geeignet. Die Anregungswellenlängen werden durch den verwendeten Farbstoff mit seinen spezifischen Absorptionseigenschaften bestimmt. Auf die Emissionseigenschaften des Farbstoffes abgestimmte dichroitische Filter stellen sicher, daß nur das vom jeweiligen Farbstoff ausgesendete Fluoreszenzlicht vom Punktdetektor gemessen wird.

In biomedizinischen Applikationen werden zur Zeit mehrere verschiedene Zellen oder Zellregionen mit verschiedenen Farbstoffe gleichzeitig markiert (Multifluoreszenz). Die einzelnen Farbstoffe können mit den Stand der Technik entweder aufgrund verschiedener Absorptionseigenschaften oder Emissionseigenschaften (Spektren) getrennt nachgewiesen werden. Dazu erfolgt eine zusätzliche Aufspaltung des Fluoreszenzlichts von mehreren Farbstoffen mit den Nebenstrahlteilern (DBS) und eine getrennte Detektion der einzelnen Farbstoffemissionen in getrennten Punktdetektoren (PMT x). Eine flexible Anpassung der Detektion und der Anregung an entsprechende neue Farbstoffeigenschaften durch den Anwender ist mit der oben beschriebenen Anordnung nicht möglich. Statt dessen müssen für jeden (neuen) Farbstoff neue dichroitische Strahlteiler und Blockfilter kreiert werden.

Überlagern sich die Emissionsspektren zweier Farbstoffe, so stoßen die bisherigen Detektionseinrichtungen an ihre Grenzen. Um ein Übersprechen zwischen beiden Farbstoffen zu vermeiden, muß der spektrale Detektionsbereich eingeschränkt werden. Der Bereich in dem sich die beiden Farbstoffe überlagern wird hierzu einfach herausgeschnitten und nicht detektiert. Somit verschlechtert sich die Effizienz der Detektionseinheit. Ein gleiches Signal- zu Rauschverhältnisses kann nur durch die Erhöhung der Anregungsleistung erzielt werden, wodurch es zu einer Präparatschädigung kommen kann. Deshalb werden heutzutage maximal bis zu 6 verschiedene Farbstoffsonden simultan eingesetzt, da die Farbstoffe sonst aufgrund der sich stark überlagernden Emissionsbänder nicht getrennt werden können.

Bisher wurden Farbstoffe so modifiziert, daß sie sich entweder in ihren Absorptionseigenschaften oder in ihren Emissionseigenschaften voneinander unterscheiden. Fig 3 zeigt die Emissionsspektren von verschiedenen typischen Farbstoffen. Aufgetragen ist das Emissionssignal in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Zu erkennen ist das sich die mit 1 bis 4 bezeichneten Farbstoffe in der Lage und der Form ihrer Emissionsspektren unterscheiden. Diese Farbstoffe sind jedoch in den meisten Fällen toxisch für Lebendpräparate. Somit sind Untersuchungen zur Evolution von Zellverbänden in Lebendpräparaten unmöglich. Ende der 90 er Jahre wurden in der Natur vorkommende Farbstoffe, die sogenannten fluoreszierenden Proteine (GFP, YFP, CFP, TOPAS, GFT, RFP) entdeckt (Firma: Clonotech, USA).

In all den o.g. Systemen werden Fluoreszenzfarbstoffe zur spezifischen Markierung der Präparate eingesetzt

Im ZEISS Laser Scanning Mikroskop META wird die Fluoreszenz spektral aufgespalten. Dazu wird das Emissionslicht im Scanmodul oder im Mikroskop (bei Mehrphotonen-Absorption) mit Hilfe des Hauptfarbteilers (MDB) vom Anregungslicht abgespalten. Ein Blockschaltbild der nun folgenden Detektoreinheit ist in Abb. 5 dargestellt. Das Licht der Probe wird nun mit Hilfe von einer abbildenden Optik PO bei konfokaler Detektion durch eine Blende (Pinhole) PH fokussiert, wodurch Fluoreszenz, die außerhalb des Fokus entstand, unterdrückt wird. Bei einer nichtdescannten Detektion entfällt die Blende. Das Licht wird nun mit Hilfe eines winkeldispersiven Elements DI in seine Spektralanteile zerlegt. Als winkeldispersive Elemente kommen Prismen, Gitter und akusto optische Elemente in Frage. Das vom dispersiven Element in seine spektralen Komponenten aufgespaltete Licht wird im Anschluß auf einen Zeilendetektor DE abgebildet. Dieser Zeilendetektor DE mißt also das Emissionssignal in Abhängigkeit von der Wellenlänge und wandelt dies in elektrische Signale um. Zusätzlich kann der Detektionseinheit noch ein Linienfilter zur Unterdrückung der Anregungswellenlängen vorgeschaltet werden.

Der dargestellte Aufbau beschreibt im wesentlichen einen Cerny Turner Aufbau. Bei einer konfokalen Detektion wird das Licht L der Probe mit der Pinholeoptik PO durch die konfokale Blende PH fokussiert. Bei einer nichtdescannten Detektion im Falle einer Mehrphotonen-Absorption kann diese Blende entfallen. Der erste abbildende Spiegel S1 kollimiert das Fluoreszenzlicht. Anschließend trifft das Licht auf ein Liniengitter G, beispielsweise ein Gitter mit einer Linienzahl von 651 Linien pro mm. Das Gitter beugt das Licht entsprechend seiner Wellenlänge in verschiedene Richtungen. Der zweite abbildende Spiegel S2 fokussiert die einzelnen spektral aufgespaltenen Wellenlängenanteile auf die entsprechenden Kanäle des Zeilendetektors DE. Besonders vorteilhaft ist der Einsatz eines Zeilen-Sekundärelektronenvervielfachers der Firma Hamamatsu H7260. Der Detektor besitzt 32 Kanäle und eine hohe Empfindlichkeit. Der freie Spektralbereich der oben beschriebenen Ausführungsform beträgt etwa 350 nm. Der freie Spektralbereich wird in dieser Anordnung gleichmäßig auf die 32 Kanäle des Zeilendetektors verteilt, wodurch sich eine optische Auflösung von etwa 10 nm ergibt. Somit ist diese Anordnung nur bedingt zur Spektroskopie geeignet. Jedoch ist ihr Einsatz in einem bildgebenden System vorteilhaft, da das Signal pro Detektionskanal aufgrund des relativ breiten detektierten Spektralbandes noch relativ groß ist. Eine Verschiebung

des freien Spektralbereiches kann zusätzlich durch eine Verdrehung beispielsweise des Gitters erfolgen.

Eine weitere mögliche Ausführungsform könnte die Verwendung eines Matrixdetektors (z.B. eine CCD) beinhalten. Hierbei wird in einer Koordinate durch das dispersive Element eine Aufspaltung in verschiedene Wellenlängenanteile vorgenommen. In der verbleibenden Richtung auf dem Matrixdetektor wird eine komplette Zeile (oder Spalte) des gescannten Bildes abgebildet. Diese Ausführungsform ist besonders vorteilhaft beim Aufbau eines Linienscanners (Lit.: Corle, Kino; „Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems“; Academic Press 1996). Der prinzipielle Aufbau entspricht im wesentlichen dem eines LSM nach Abb. 2. Jedoch wird statt eines Punktfokus eine Linie in den Fokus abgebildet und die zu untersuchende Probe nur noch in einer Richtung gescannt. Als konfokale Blende dient in einem solchen Aufbau statt einer Lochblende eine Schlitzblende. Eine nichtdescannte Detektion bei Verwendung einer Mehrphotonen-Absorption kann auch mit dieser Anordnung erfolgen. Hierzu kann wiederum die konfokale Blende entfallen.

Durch die spektrale Aufspaltung des Fluoreszenzlichtes kann nach Erfassung der Fluoreszenzspektren von Fluoreszenzmarkern in Reinform und der Erfassung von Spektren mit Fluoreszenzanteilen mehrerer Marker durch ein „unmixing“- Verfahren eine getrennte Erfassung der Spektralanteile erfolgen ( DE 19915137 A1).

#### **Erfindung:**

Erfindungsgemäß ist nun erkannt worden, daß sich die Zahl der für die Fluoreszenzmarkierung verwendeten Fluoreszenzmarker verringern kann oder eine Kombinatorik ausgenutzt werden kann, wenn nicht nur Fluoreszenzspektren in Reinform als Referenzspektren verwendet werden sondern auch Referenzspektren von Mischformen aufgezeichnet werden. Diese Mischformen können beispielsweise durch den zeitabhängigen Färbezustand eines biologischen Materials charakterisiert sein, wenn ein Fluoreszenzmarker langsam zu einer Verfärbung führt.

Weiterhin können derartige Mischzustände durch eine Mischfarbe gekennzeichnet sein, wenn ein Fluoreszenzmarker seine Farbe bzw. seine Anregungseigenschaften wechselt.

Derartige Mischungsverhältnisse können auf verschiedene Weise erzeugt werden: Sie können in der Probe vorhanden sein, durch Bestrahlung der Probe erzeugt werden oder Ergebnis eines biologischen Prozesses sein, der durch eine Bestrahlung angeregt wird.

Mischspektren können einen biologischen Prozeß charakterisieren, beispielsweise eine Konzentrationsänderung, wobei ein erstes Spektrum einem geringeren Konzentrationszustand und mindestens ein weiteres Spektrum einem höheren Konzentrationszustand entspricht.

Mittels der unterschiedlichen Referenzspektren werden Bildkanäle definiert und entsprechend ausgewertet. Die Erzeugung derartiger Referenzen kann über das gesamte Bild oder vorteilhaft über markierte „regions of interest“ (ROI) erfolgen. Über derartige ROI kann auch eine gezielte Manipulation durch definierte Bestrahlung erfolgen. Es kann weiterhin in einer ersten Region eine Referenz bestimmt werden und in mindestens einer weiteren Region eine gezielte Bestrahlung und Messung durch Extrahierung von Mischspektren erfolgen. Eine Entmischung und Darstellung der Spektren kann nach der Bildaufnahme oder während der Bildaufnahme erfolgen.

Überraschend ergibt sich, daß neuartige Marker wie das fluoreszierende Protein Kaede, das sich bei Bestrahlung von grün nach rot verfärbt (Lit: Ando, R., Hama, H., Yamamoto-Hino, M., Mizuno, H., and Miyawaki, A. (2002), An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. PNAS 99/20, 12651-12656) bei der Erfassung von organischen Vorgängen, beispielsweise inter- und intrazellulärer Vorgänge und zur Markierung einzelner Zellen bzw. Zellpopulationen, eingesetzt und spektral detektiert werden kann. Photokonvertierbare Farbstoffe, die dynamisch ihre Spektren aufgrund von intrazellulären Vorgängen verändern bzw. Farbstoffe, die für FRET verwendet werden aber auch andere Indikatorfarbstoffe, können durch das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhaft eingesetzt werden.



Beispielsweise können in einer Zellpopulation, die mit dem Farbstoff Kaede markiert worden ist,

unterschiedliche Zellen oder Zellgruppen unterschiedlich lang mit UV oder violetterm Licht beleuchtet bzw. konvertiert werden. Dadurch stellen sich unterschiedliche Farbmischverhältnisse ein, die als Referenzspektren erfaßt werden. Anschließend können unterschiedliche Zellpopulationen einzeln über die Zeit erfaßt werden.

Das trifft nicht nur für Zellkulturen zu sondern kann sowohl subzelluläre Strukturen als auch ganze Organismen betreffen, wobei eine bestimmte Zellpopulation bestrahlt und in ihrer Entwicklung beobachtet werden kann, indem die resultierenden Referenz bestimmten Bildkanälen zugewiesen und so verfolgt werden kann.

Über die ROI kann jeweils ein Bereich ausgewählt werden. Es kann eine Analyse von Transportprozessen auf zellulärem und subzellulärem Niveau erfolgen.

Vorteilhaft kann nur noch ein Farbstoff verwendet werden, der beispielhaft durch Bestrahlung oder andere Einwirkungen in verschiedene Zustände versetzt wird, die über Referenzbildung eindeutig identifizierbar sind.

Auch ein unterschiedlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität wie bei PA-GFP (photoaktivierbares GFP, Lit. Patterson, G.H., and Lippincott-Schwartz, J. (2002), A photoactivatable GFP for selective photobleaching of proteins and cells. Science 297, 1873-1877) nach Anregung mit violettem Licht kann als Referenz dienen.

Beim Zeiss LSM META können ROIs direkt im Bild interaktiv definiert werden. Der ausgewählte Laser wird pixelgenau an der Grenze dieser Regionen ein- und ausgeschaltet.

Im Timeseries Dialog werden Start und Ende einer Zeitserie sowie Intervalle und Delays zwischen den Aufnahmen festgelegt. Automatisch eingebunden werden können hier auch die Bestrahlungsparameter, die zur Veränderung der Farbstoffeigenschaften durch Photoaktivierung bzw. Photokonversion führen wie beispielsweise Wiederholungsrate, Wellenlänge, Intensität, Position.

Die Auswertung kann nach dem Experiment oder online schon während der Aufnahme erfolgen, um direkt in den Ablauf des Experimentes eingreifen zu können.

Die mittleren Intensitäten der ROI im Zeitverlauf sowie die Zeiten von Photoaktivierungen und Konversionen werden angezeigt.

Der META Detektor erlaubt es, das gesamte Spektrum der Emission, beispielsweise von Kaede zu erfassen und die jeweiligen Mischformen während der Messung spektral zu trennen und die entmischten Kanäle anzuzeigen.

In Fig. 4 wird schematisch dargestellt, wie unterschiedliche Bildkanäle CH1-CH3 gebildet werden, wobei wie dargestellt, unterschiedliche spektrale Mischverteilungen CH1-3 als Referenz verwendet und zur Bildauswertung herangezogen werden.

## Patentansprüche

1.

Verfahren zur Fluoreszenzmikroskopie, insbesondere mit einem Laser-Scanning-Mikroskop, wobei eine zumindest teilweise spektral aufgelöste Detektion des Fluoreszenzspektrums erfolgt und Referenzspektren zur spektralen Entmischung herangezogen werden, dadurch gekennzeichnet, daß die Aufnahme der Referenzspektren von zeitlich und / oder spektral veränderlichen Farbstoffen und/ oder Farbstoffkombinationen erfolgt und zur Bildauswertung dient.

2.

Verfahren nach Anspruch 1, zur Erfassung von organischen Vorgängen.

3.

Verfahren nach Anspruch 2, zur Erfassung intrazellulärer Vorgänge.

4.

Verfahren nach Anspruch 2, zur Erfassung interzellulärer Vorgänge.

5.

Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 4, zur Erfassung von Zellen und/oder Zellpopulationen.

6.

Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 5, wobei eine Aufnahme von Referenzspektren photokonvertierbarer Farbstoffe erfolgt.

7.

Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 7, wobei eine Aufnahme von Referenzspektren photoaktivierbarer Farbstoffe erfolgt.

8.

Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 7, wobei eine Aufnahme von Referenzspektren von Indikatorfarbstoffen erfolgt.

9.

Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 8, wobei eine Aufnahme von Referenzspektren von Farbstoffen erfolgt, die dynamisch ihre Spektren aufgrund von intrazellulären Vorgängen verändern .

10.

Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 9, wobei eine Aufnahme von Referenzspektren von Farbstoffen bei unterschiedlichem Anstieg der Fluoreszenzintensität erfolgt.

11.

Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 10, wobei eine Aufnahme von Referenzspektren vom fluoreszierenden Protein Kaede erfolgt.

12.

Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 11, wobei eine Aufnahme von Referenzspektren von PA-GFP erfolgt.

## **Zusammenfassung**

Verfahren zur Fluoreszenzmikroskopie, insbesondere mit einem Laser-Scanning-Mikroskop, wobei eine zumindest teilweise spektral aufgelöste Detektion des Fluoreszenzspektrums erfolgt und Referenzspektren zur spektralen Entmischung herangezogen werden,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
die Aufnahme der Referenzspektren von zeitlich und / oder spektral veränderlichen Farbstoffen und/ oder Farbstoffkombinationen erfolgt und zur Bildauswertung dient.

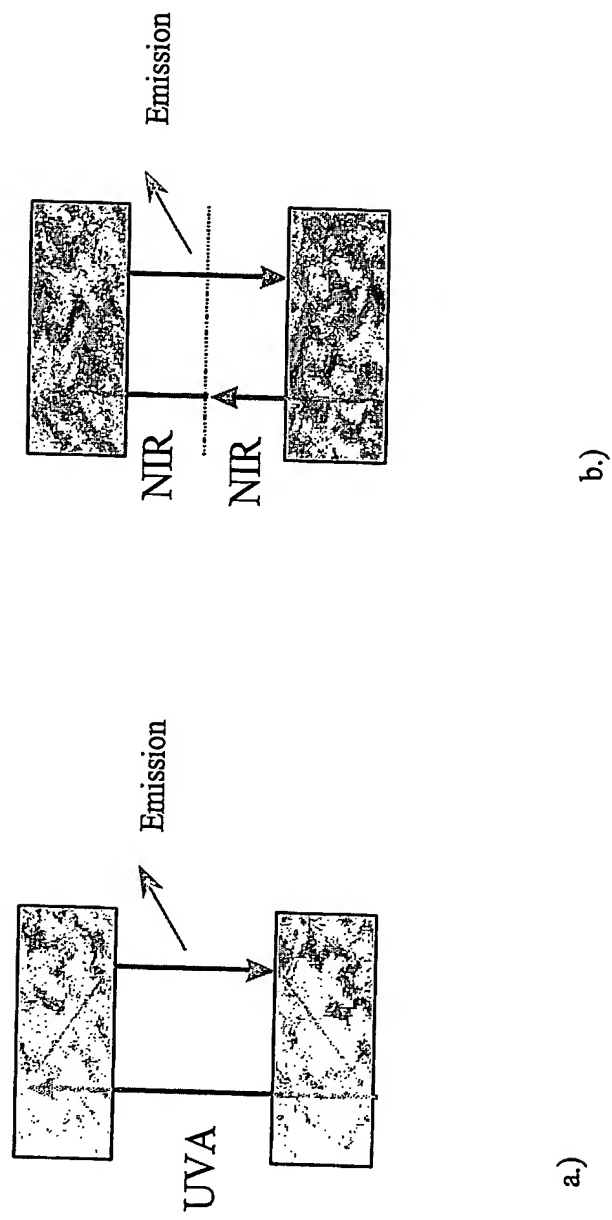


Figure: 1

a.) Einphotonen-Absorption, b) Mehrphotonen-Absorption

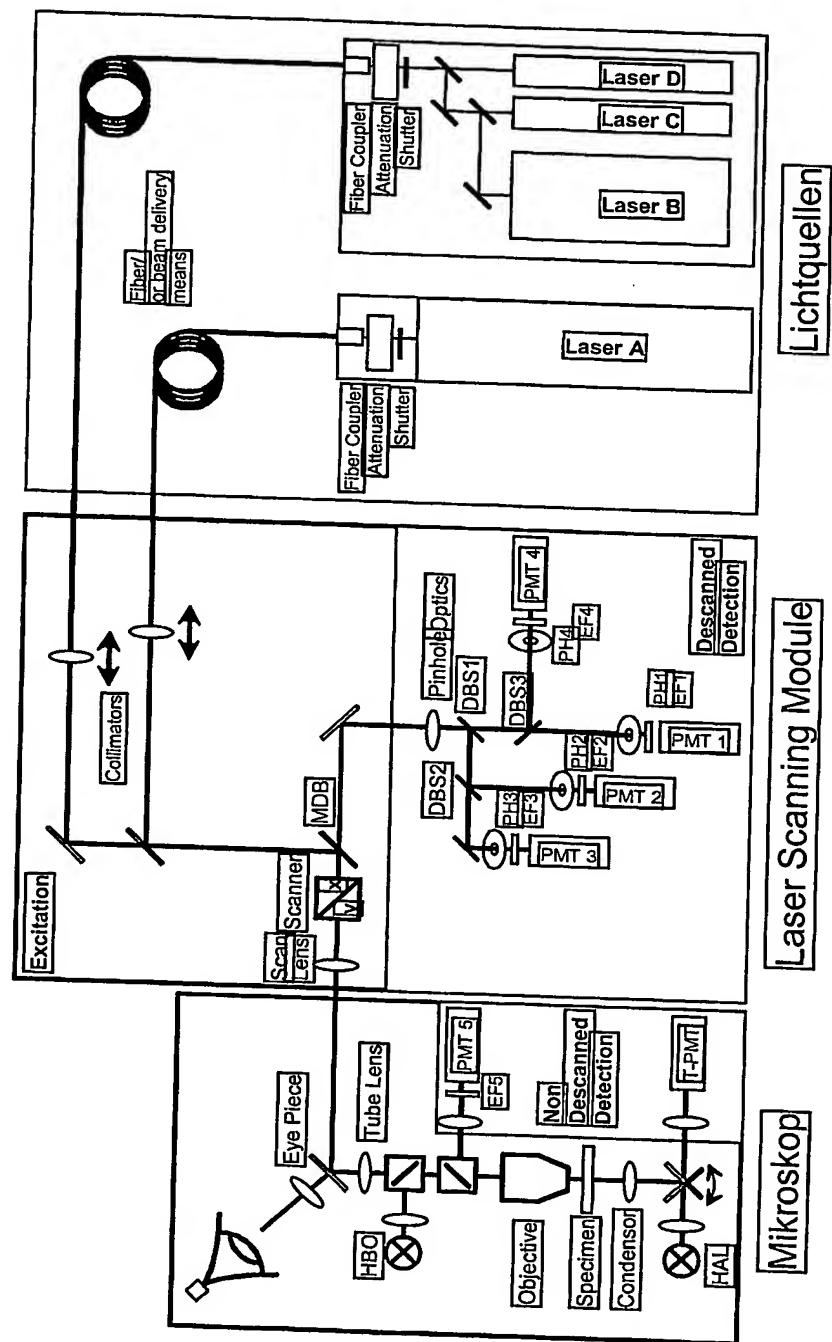


Figure: 2

Aufbau LSM (Stand der Technik)

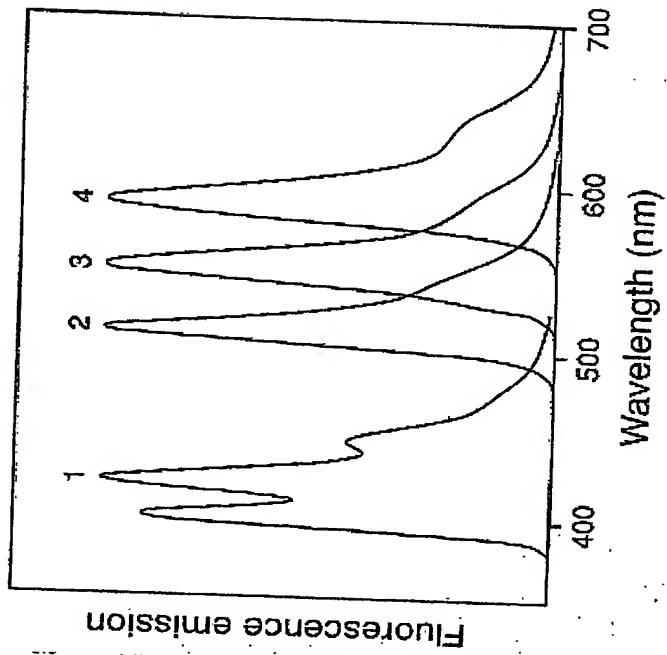
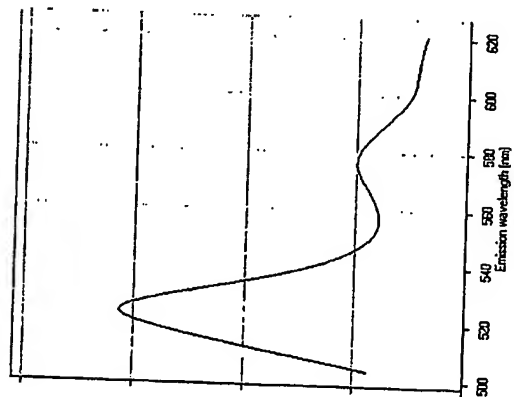
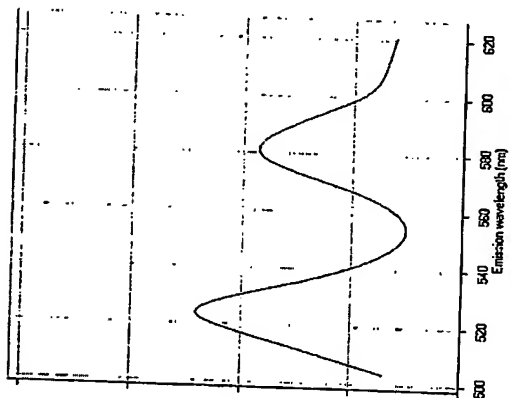


Figure: 3

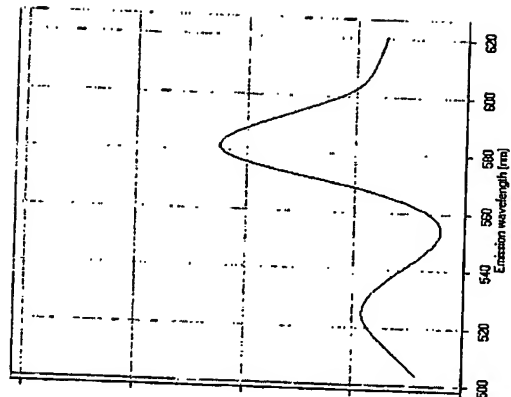




CH 1



CH 2



CH 3

Figure: 4

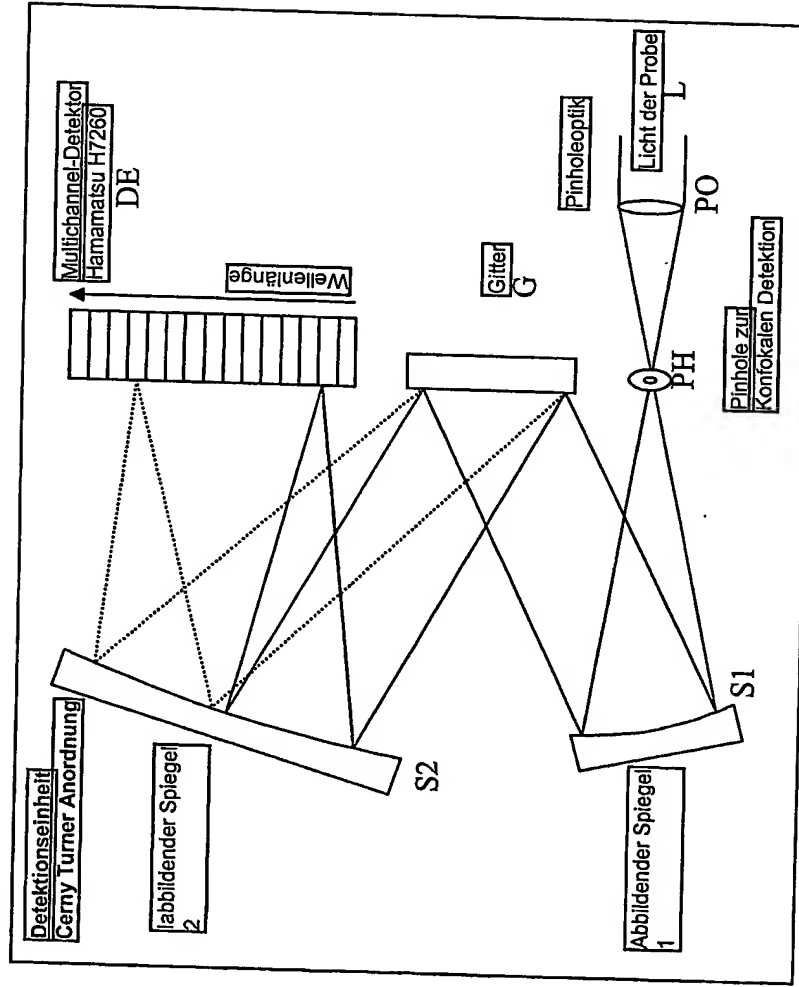


Figure: 5

Beispiel Aufbau Detektoreinheit / Optik